

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :	C12N 15/55, 9/16, 5/10, C07K 16/40, G01N 33/50, A61K 38/43, A01K 67/027	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/07855 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP98 05127		
(22) Internationales Anmeldedatum:	11. August 1998 (11.08.98)		
(30) Prioritätsdaten:	197 34 764.9 11. August 1997 (11.08.97) DE 197 58 501.9 15. Oktober 1997 (15.10.97) DE 60 078,386 18. März 1998 (18.03.98) US		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, AR IPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MÈMOREC STOFFEL GMBH [DE DE]; Stöckheimer Weg 1, D-50829 Köln (DE).			
(72) Erfinder; und			Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STOFFEL, Wilhelm [DE DE]; Komelminsterstrasse 14, D-50933 Köln (DE). HOFMANN, Kay [DE DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE). TOMIUK, Stephan [DE DE]; Laboratorium für Molekulare Neurowissenschaften, Institut für Biochemie, Med. Fak., Joseph-Stelzmann-Strasse 52, D-50931 Köln (DE).		Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

(54) Title: NEUTRAL SPHINGOMYELINASE

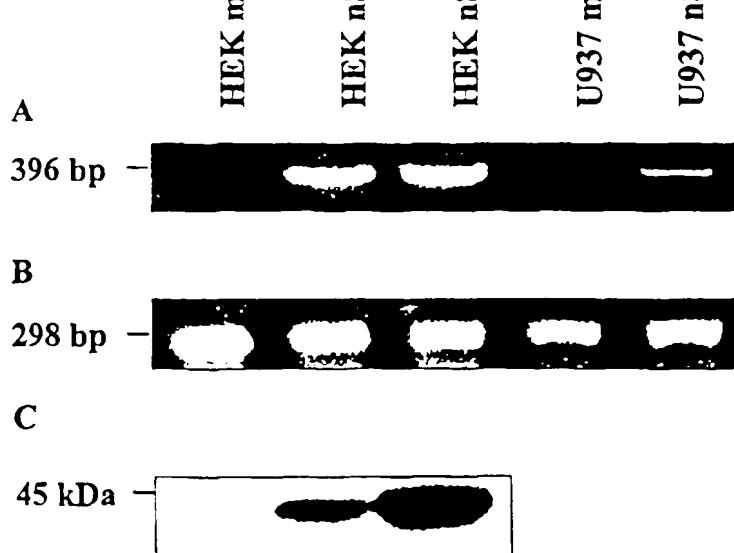
(54) Bezeichnung: NEUTRALE SPHINGOMYELINASE

(57) Abstract

The invention relates to eukaryotic neutral sphingomyelinase (nSMase) and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und seine Anwendung.



#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxenburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Neutrale Sphingomyelinase

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren, und ihre Anwendung.

Sphingomyelin ist eine wesentliche Komponente von Plasmamembranen. Der Abbau des Sphingomyelins gibt eine Vielzahl von Substanzen, die potentielle second messenger Eigenschaften haben, z.B. Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat. Es sind zwei sphingomyelin-spaltende Enzymaktivitäten bekannt, zum einen die der lysosomalen sauren Sphingomyelinase und zum anderen die der plasmamembran-gebundenen neutralen Sphingomyelinase.

Die bakterielle neutrale Sphingomyelinase ist ein sezerniertes, lösliches Protein.

Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals Nukleinsäuren, codierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, verfügbar gemacht. Die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase (nSMase) ist dadurch charakterisiert, daß sie Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und die Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist. Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym. Die maximale Aktivität wird im neutralen pH-Bereich erzielt.

Figur 1 zeigt die Gensequenz der humanen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 2 zeigt die Gensequenz der murinen neutralen Sphingomyelinase.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse von Northern- und Westernblots nSMase-überexprimierender Zelllinien.

- 2 -

Figur 4 zeigt die Strategie zur Erzeugung von murinen Knockout-Mutanten. Die Buchstaben symbolisieren Restriktionsschnittstellen.

Figur 5 zeigt Konstrukte zur Gewinnung transgener Mausmutanten.

Bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäure um eine Nukleinsäure, die für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers codiert. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich dabei um die humane und murine neutrale Sphingomyelinase. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen sind als Seq. ID. Nr. 3 und Seq. ID. Nr. 4 offenbart.

Teile der Nukleinsäuresequenzen stimmen mit der EST-Sequenzen AA028477 und AA013912 (murin) und W32352 und AA056024 (human) überein.

Bei Kenntnis der Aminosäure- und Nukleinsäurestruktur der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase kann der Fachmann unter Berücksichtigung der hohen Homologie zwischen der humanen und murinen nSMase die entsprechenden Nukleinsäuren und Proteine aus anderen Eukaryonten leicht auffinden. Dazu kann er zum einen kreuzreagierende Antikörper für eine spezifische affinitätschromatographische Aufreinigung einsetzen, oder er kann auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenz Oligonukleotidprimer synthetisieren und die gesuchten Nukleinsäuren mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion in einer cDNA-Bank des Eukaryonten amplifizieren. Die entsprechende cDNA-Bank kann durch Isolierung von mRNA aus einer Gewebeprobe und anschließende Reverse-Transkription in an sich bekannter Weise erhalten werden. Aus der Nukleinsäuresequenz kann mit Hilfe des genetischen Codes die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Alternativ ist es hierzu auch möglich, homologe Sequenzen in EST (Expressed Sequence Tags) -Datenbanken zu suchen und zu kombinieren.

- 3 -

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich zur Expression der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in pro- oder eukaryontischen Systeme. Darüber hinaus sind sie auch zur Expression der nSMase in vivo im Sinne einer Gentherapie oder insbesondere in Form von Fragmenten auch in komplementärer Struktur als Antisense-Nukleotide zur Verringerung der Expression der nSMase geeignet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältliche eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.

Die erfindungsgemäße nSMase lässt sich durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen herstellen. Insbesondere sind eukaryontische Expressionssysteme geeignet. Entsprechende eukaryontische Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt wie beispielsweise pRc/CMV (Firma Stratagene). Die Aufreinigung aus gentechnisch veränderten Organismen bietet, insbesondere im Falle der Überexpression, ein leichten und direkten Zugang zur erfindungsgemäßen nSMase und erlaubt darüber hinaus die Isolierung in größeren Mengen.

Bevorzugt handelt es sich um die eukaryontische neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere um humane oder murine neutrale Sphingomyelinase. Die Aminosäuresequenzen der humanen und murinen neutralen Sphingomyelinase sind als Seq. ID. Nr. 1 und 2 wiedergegeben.

Die Molekulargewichte der humanen bzw. murinen Sphingomyelinase beträgt 47,6 bzw. 47,5 kDa. Im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen enthalten die erfindungsgemäßen nSMasen von Säugetieren keine Signalsequenz am N-Terminus. Aufgrund der Hydrophobizi-

- 4 -

tätsanalyse kann davon ausgegangen werden, daß zwei benachbarte hydrophobe Membrandomänen am C-Terminus durch acht Aminosäuren getrennt sind. Es scheint sich daher um integrale Membranproteine zu handeln, deren katalytisch aktive Domäne zum Cytosol zeigt, während nur ein geringer Anteil der Enzyme Kontakt zur extrazellulären Umgebung hat. Dies ist im Gegensatz zu den bakteriellen nSMasen, bei denen es sich um sekretierte, lösliche Proteine handelt, ist aber in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen zu den Eigenschaften der neutralen Sphingomyelinnasen von Säugetieren. Die 1,7 kb mRNA der murinen nSMase wird gemäß Northern Blot Analyse in allen Geweben exprimiert. In Nieren, Hirn, Leber, Herz und Lunge zeigt der Northern Blot ein starkes Signal, während die Expression in der Milz gering zu sein scheint. Diese Messung war nicht in Übereinstimmung mit den gemessenen enzymatischen Aktivitäten der entsprechenden Gewebe. Dies spricht für eine posttranskriptionale Regulation der nSMase.

Das pH-Optimum der erfindungsgemäßen neutralen Sphingomyelinase liegt im Bereich von 6,5 bis 7,5 mit einem  $K_m$ -Wert für C18 Sphingomyelin im Bereich von 1,0 bis  $1,5 \times 10^{-5}$  M. Die Aktivität ist magnesiumionenabhängig, die Zugabe von EDTA führt zu einer Inhibierung der SMase-Aktivität, kann jedoch durch Zugabe von  $Mn^{2+}$ - oder  $Mg^{2+}$ -Ionen wiederhergestellt werden. Die Zugabe von 0,3 bis 0,5% Triton X-100 erhöht die Enzymaktivität. Die Aktivität ist unbeeinflußt durch Behandlung mit DTT oder 2-Mercaptoethanol, wohingegen die Zugabe von 20 mM Glutathion zur Inhibition führte. Die Aktivität der nSMase ist nicht auf Sphingomyelin limitiert, auch das strukturell verwandte Phosphatidylcholin wurde mit etwa 3% Aktivität gespalten.

Weiterhin beansprucht werden Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase. Unter den Begriff "Varianten" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) und an-

- 5 -

schließende Expression erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen und/oder immunologischen Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase entsprechen. Dabei können sowohl Aminosäuren deletiert, eingefügt oder konservativ ausgetauscht werden. Konservativer Austausch bedeutet, daß eine Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wird, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist.

So sind beispielsweise folgende Aminosäuren austauschbar: Serin für/gegen Alanin, Alanin für/gegen Glycin, Methionin für/gegen Serin, Lysin für/gegen Arginin, Lysin für/gegen Serin.

Insbesondere umfaßt der Begriff Varianten auch N- und/oder C-terminale verkürzte Proteine sowie acetylierte, glykosylierte, amidierte und/oder phosphorylierte Derivate.

Die Aktivität der nSMase scheint zumindest zum Teil im C-terminalen Bereich zu liegen, da das Fragment 1 bis 282 der murinen nSMase bei Expression in HEK293 Zellen keine Erhöhung der Sphingomyelinase-Aktivität zeigte. C-terminale Fragmente der nSMase sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Auch Verbindungen, bei denen nSMase oder seine Varianten mit weiteren Molekülen wie Farbstoffe, Radionukliden oder Affinitätskomponenten gekoppelt sind, stellen erfindungsgemäße Varianten dar.

Beansprucht werden auch Nukleinsäuren, die für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase codieren bzw. komplementär zu diesen Nukleinsäuren sind. Bei den Nukleinsäuren kann es sich beispielsweise um DNA, RNA, PNA oder um nukleaseresistenter Analoga handeln. Nukleaseresistente Analoga sind insbesondere solche Verbindungen, in denen die Phosphodiesterbindung durch hydrolysestabile Verbindungen modifiziert sind, beispielsweise Phosphothioate, Methylphosphonate o.ä.

Für Antisensenuklectide sind insbesondere kurze Fragmente der Nukleinsäuren geeignet. Diese sollten aus Gründen der Spezifität bevorzugt mehr als 6, noch mehr bevorzugt mehr als 8 und am

- 6 -

meisten bevorzugt mehr als 12 Nukleotide aufweisen. Aus Gründen der Diffusion und der Kosten haben sie üblicherweise eine Länge von weniger als 30 Nukleotiden, bevorzugt 24 oder weniger und noch mehr bevorzugt 18 oder weniger Nukleotide.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von Nukleinsäuren, die für diagnostische oder therapeutische Zwecke mit anderen Molekülen gekoppelt sind, beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Markern oder Affinitätskomponenten, sowie Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und der zu diesen Nukleinsäuren komplementären Nukleinsäuren sowie Varianten der Nukleinsäuren.

Fragmente bezeichnet dabei Nukleinsäuren, die am 5' oder 3' oder an beiden Seiten verkürzt sind. Unter dem Begriff "Varianten" wird verstanden, daß diese Nukleinsäuren unter stringenten Bedingungen mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. dazu komplementären Nukleinsäuren hybridisieren. Unter dem Begriff "stringente Bedingungen" wird verstanden, daß die Hybridisierung bei Bedingungen durchgeführt wird, bei der die Temperatur noch bis zu 10°C unter der Temperatur liegt (bei sonst identischen Bedingungen), bei der exakt komplementäre Nukleinsäuren gerade noch hybridisieren würden. Wenn beispielsweise eine exakt hybrisierende Nukleinsäure unter gegebenen Bedingungen bis zu einer Temperatur von ca. 55°C hybridisiert, dann sind stringente Bedingungen Temperaturen gleich oder höher 45°C. Bevorzugt ist der Temperaturbereich für stringente Bedingungen von 5°C, noch mehr bevorzugt von 3°C.

Des Weiteren betrifft die Erfindung Antikörper, die gegen die erfindungsgemäße nSMase oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gerichtet sind. Diese Substanzen eignen sich insbesondere zum Einsatz in der Diagnostik, dem Fachmann an sich bekannten Immunoassays, zur histologischen Untersuchung sowie als Arzneimittel zur Behandlung von Zuständen, die mit einer Überexpression der nSMase verbunden sind. Solche erfindungsgemäßen Antikörper können mit dem Fachmann an sich bekannten Verfahren durch

- 7 -

Immunisierung mit nSMase, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Peptid- und Nukleinsäurenfragmenten in Gegenwart von Hilfsreagenzien erhalten werden.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Zelllinien, die die erfindungsgemäße nSMase überexprimieren. Solche Zelllinien sind erhältlich durch Transfektion mit Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für nSMase kodieren, enthalten. Im Falle von eukaryontischen Zelllinien kann die Transfektion beispielsweise durch Elektroporation erfolgen. Die Zelllinien sind dabei vorzugsweise stabiltransfiziert.

Überexpression bedeutet in diesem Zusammenhang, daß diese Zelllinie eine höhere Aktivität der nSMase aufweisen als die Zelllinien, die nicht mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transfiziert wurden. Geeignete eukaryontische Zelllinien sind beispielsweise die Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat.

Die Zelllinien zeigten in Experimenten eine spezifische nSMase-Aktivität zwischen 0,3 und 10 µmol/mg Protein/Stunde.

Figur 3 zeigt die Northern und Western Blot Analyse der nSMase-Expression in transfizierten Zelllinien. Teil A zeigt dabei das Ergebnis einer RT-PCR der Gesamtzelle RNA mit Primern, die mit humaner und muriner nSMase cDNA hybridisieren. Teil B zeigt als Kontrolle die T-PCR der Gesamt-RNA mit Primern, die zu humanem β-Actin cDNA hybridisieren. Teil C zeigt den Westernblot des Plasma Membran Proteinextrakts von verschiedenen HEK 293 Zelllinien nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit dem polyklonalen Anti-nSMase-Antikörpern.

Die Zugabe von 0,5 mM Arachidonsäure führte zu einer dreifachen Erhöhung der nSMase-Aktivität in den überexprimierenden HEK-Zellen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein transgenes Säugetier, das eine Überexpression (gain of function) oder eine Gendefi-

zienz bzw. einen Gendefekt (loss of function) für die erfindungsgemäße nSMase aufweist. Bevorzugt handelt es sich bei dem Säugetier um ein Nagetier, insbesondere eine Maus. Diese transgenen Säugetiere sind durch für den Fachmann an sich bekannte Verfahren erhältlich und eignen sich insbesondere zur Funktionsaufklärung der neutralen Sphingomyelinase. Für transgene Säugetiere werden definierte Genkonstrukte durch DNA-Mikroinjektion in den Vorkern (Pronukleus) einer befruchteten Eizelle im Einzellstadium injiziert, um die Expression des zusätzlichen Gens zu erreichen. Durch zielgerichtete Veränderung eines Gens im Genoms von ES-Zellen, die nachfolgend in Blastozysten injiziert werden, wird die Funktion eines Gens ausgeschaltet.

Die Strategie und Konstrukte zur Generierung der Mausmutanten sind in Figur 4 und 5 gezeigt.

Bevorzugt handelt es sich bei den transgenen Tieren um Tiere, bei denen das Gen zeitlich und gewebsspezifisch von außen induzierbar ein- bzw. ausgeschaltet werden kann. Entsprechende transgene Säugetiere eignen sich insbesondere zur Aufklärung der mit der erfindungsgemäßen nSMase im Zusammenhang stehenden Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen, die wiederum diagnostische oder therapeutische Anwendungen eröffnen. Insbesondere eignen sich die transgenen Säugetiere zum Screening von pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die erfindungsgemäße eukaryontische neutrale Sphingomyelinase, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie die erfindungsgemäßen Antikörper können in Arzneimitteln und Diagnostikmitteln gegebenfalls zusammen mit weiteren Hilfsstoffen enthalten sein. Diese Arznei- und Diagnostikmittel eignen sich zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apotose beruhen.

- 9 -

Insbesondere sind dies Erkrankungen, bei denen Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen und Stoffwechselstörungen eine Rolle spielen. Dies können beispielsweise Krebserkrankungen oder Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) sein.

Ein erfindungsgemäßes pharmazeutisches Screening-Verfahren beruht auf der Veränderung der Expression oder Aktivität der erfindungsgemäßen nSMase in nSMase-überexprimierenden Zelllinien bei Zugabe von mindestens einer potentiell pharmazeutisch wirksamen Substanz. Die Zelllinien eignen sich somit insbesondere zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.

Die Erfindung soll durch die folgenden Beispiele weiter erläutert werden.

#### **Beispiel 1**

##### *Klonierung der Nukleinsäure*

Die erfindungsgemäßen für die neutrale Sphingomyelinase kodierenden Nukleinsäuren wurden in die NotI Schnittstellen der Klonierungsstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pRc/CMV (Stratagene) kloniert. Die erhaltenen Sequenzen wurden durch Sequenzierung mit einem Perkin-Elmer DNA-Sequenzer 377A erhalten.

#### **Beispiel 2**

##### *Klonierung der RNA*

Die Gesamt-RNA wurde nach bekannten Methoden aus verschiedenen Organen von acht drei Wochen alten CD1 Mäusen isoliert und Poly(A<sup>+</sup>)-RNA wurde durch Affinitätsreinigung an Oligo(dT)cellulose (Boehringer Mannheim Deutschland) gemäß Standardmethoden isoliert.

- 10 -

### Beispiel 3

#### Überexprimierende Zelllinien

U937 Zellen wuchsen in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälber-serum, 1 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 0,03% Glutamin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 5x10<sup>6</sup>-Zellen wurden mit 1 µg linearisierter Plasmid-DNA, die für die erfindungsgemäße nSMase kodierte durch Elektroporation mit einem "gene pulser" (Firma Bio-Rad) transfi-ziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte unter 1 mg/ml Geneticin (G418, Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Die aus den Zelllinien aufgereinigte nSMase zeigte eine spezifi-sche Aktivität zwischen 0,3 und 10 µmol/mg Protein/Stunde. Das pH-Optimum lag bei 6,5 und 7,5. Der K<sub>m</sub>-Wert für C18 Sphingo-myelin betrug 1,0 bis 1,5 x 10<sup>-5</sup> M. Die Aktivität war von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig; die Zugabe von EDTA inhibierte die Aktivität.

### Beispiel 4

#### Messung der nSMase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität wurde in Zellen und Mäusegewebe untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewa-schen und bei 1.000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in Lysepuff-fer resuspendiert und die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerstört. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2.500 g gefolgt von einer Extraktion mit Lysepuffer mit 0,2% Triton X-100. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 100.000 g.

Gewebe von drei Wochen alten Mäusen wurde in kaltem Lysepuffer homogenisiert. Die zu untersuchende Menge an Protein oder homogenisiertem Gewebe wurde mit 10 nm (80.000 dpm) [N-<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] - Sphingomyelin für 30 min bei 37° in einem Gesamtvolume von 200 µl inkubiert. Dann wurden 100 µl Wasser zugesetzt und unreagiertes Substrat durch Extraktion mit Chloroform-Methanol (2:1, v/v) entfernt. Die Radioaktivität der wäßrigen Phase, die

- 11 -

das enzymatisch freigesetzte Phosphocholin enthielt, wurde in einem Sintillationszähler gemessen.

**Beispiel 5**

**Polyklonale Antikörper**

Kaninchen wurden mit dem synthetischen Peptide CDPHSDKPFSDHE (entsprechend den Aminosäuren 261 bis 273 der murinen nSMase) gekoppelt an Keyhole-Limpit-Hemocyanin immunisiert. Das polyclonale Antikörperserum wurde durch Chromatographie an Hydroxyapatit und Affinitätschromatographie an einer Säule, an der das oben genannte synthetische Peptide gebunden war, gereinigt.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
2. Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sie für die neutrale Sphingomyelinase eines Säugetiers, insbesondere für humane oder murine neutrale Sphingomyelinase kodiert.
3. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die neutrale Sphingomyelinase Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin spaltet und ihre Aktivität von der Zugabe von Magnesiumionen abhängig ist.
4. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 3 oder Seq. ID. Nr. 4.
5. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um DNA, RNA, PNA oder nukleaseresistente Analoga handelt.
6. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mRNA, cDNA oder genomische DNA handelt.
7. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zur Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 ist.
8. Eukaryontische neutrale Sphingomyelinase erhältlich durch Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 6, insbesondere mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 1 oder Seq. ID. Nr. 2.

9. Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 oder eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 gerichtet sind.
10. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 überexprimiert.
11. Zelllinie gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine eukaryontische neutrale Sphingomyelinase exprimierende Zelllinie handelt, die auf den Zelllinien U937, HEK 293 oder Jurkat beruht.
12. Transgenes Säugetier mit Überexpression (gain of function) oder Gendefizienz oder Gendefekt (loss of function) für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase.
13. Transgenes Säugetier gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
14. Arzneimittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
15. Diagnostikmittel enthaltend eukaryontische neutrale Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8, eine Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 9 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
16. Verwendung der Arzneimittel gemäß Anspruch 14 oder der Diagnostikmittel gemäß Anspruch 15 zur Diagnose und Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Über- oder Unterexpression und/oder einer erhöhten oder verminderten Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase und/oder

-14-

auf Störungen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und/oder Apotose beruhen.

17. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Erkrankungen um Entzündungsprozesse, Zellwachstumstörungen, Krebs und/oder Stoffwechselstörungen wie Störungen der Cholesterinhomöostase (Arteriosklerose) handelt.
18. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Expression oder Aktivität der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase in Zelllinien gemäß Anspruch 10 bei Zugabe von mindestens einer möglichen pharmazeutisch wirksamen Substanz gemessen wird.
19. Verwendung der Zelllinie gemäß Anspruch 10 zur Entwicklung und Prüfung von pharmazeutischen Leitstrukturen.
20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8 durch chemische Peptid-synthese oder durch Expression in gentechnisch veränderten Organismen, insbesondere in eukaryontischen Expressionssystemen.
21. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 durch chemische Synthese oder durch Vervielfältigung in gentechnisch veränderten Organismen.
22. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um das Gen für eukaryontische neutrale Sphingomyelinase handelt und neben codierenden Bereich (Exons) nicht codierende Bereiche (Introns) aufweist, insbesondere ein Gen mit der Sequenz gemäß Seq. ID. Nr. 5 und Seq. ID. Nr. 6.

-15-

23. Varianten der eukaryontischen neutralen Sphingomyelinase gemäß Anspruch 8.
24. Nukleinsäure gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Derivate, Fragmente oder Varianten der Nukleinsäuren handelt.

1 / 12

## human neutral Sphingomyelinase (NSM) Gene Sequence

ACCGCGGCCGTCGCTGGAGAGTTCGAGGCCCTAGCCCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
 TGGCGCCGGCAGCGACCTCTCAAGCTCGCCGATCGGGGACCTCGAGGGTTGGTACT  
**E I**  
 AGCCCAACTTCTCCCTGCGACTCGGGATCTCACCTCAACTGCTGGTGAGTGCCTG  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
 TC GG GT GA AG AG GG AC G CT G AC G C CT AG A AG TT GG AG TT G AC G ACC ACT C AC G C AG AC G  
 GG AG TG CG GT CT GGGG G C AC CCT CC G TT CG C ACC C AT G C AG C C T C C T C C C C T AT C C C  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
 CCT CA CG CC AG AC C C C C G GT GG A AGG C A AG C GT GGG T AC G T CG G A AGG A GGG G G AT AG G G  
 G C C C C A C G AT CT C AG G G T G T A G G G A A A C C C G A A C C T C C A A A G T C C A C A T C T G G C C C A G  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240  
 U GGG GT G C T A G A G T C C C A C A T C C C T T T G G G C T T G G A G G T T T C A G G T G T A G A C C G G G T C  
 G C C C G T G G T C C C A G C A G T C C C T C C C T G C C C G C T T C C C T C C T T A G G G G C A T T C C  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
 G C G G C C A C C A G G G T C G T C A C C G G A G G G G A C G G G G C A G A A G G G A A G G A A T C C C G T A A G G  
 G T A C T T G A G C A A G C A C C G G G C G A C C G A T G A G G C C T G G G A G A C T T C T G A A C C A G G A  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
 C A T G A A C T C G T C G T G G C C C G G C T G G C G T A C T C C G C G A C C C T C T G A A A G A C T T G G T C C T  
**E II**  
 G A G C T T C G A C C T G G C T T T G C T G G A G G G A G G T G A G A T T G T G C A G C A C G G T G C G G A A C C C A G G  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420  
 C T C G A A G C T G G A C C G A A A C G A C C T C C T C A C T C T A A C A C G T C G T G C C A C G C C T T G G G T C C  
 C T G G G A G G G A C A G A C C G T C C C A C T G G G A A A G A C C A A G C A G G C A T C C T C A C C G C T C  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480  
 G A C C C T C C T C C T G T C T G G C A G G G T G A C C C T T T C T G G T T C G T C C G T A G G A G T G G C G A A G  
 C C T C A G G T G T G G A G T G A G C C A G G A C T T C C A G T A C C T G A G A C A C G A A G G C T G T C A C C T A C C T A C  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540  
 G G A G T C C A C A C C T C A C T C G T C C T G A A G G T C A T G G A C T C T G T C T T C G A C A G T G G A T G G A T G  
**E III**  
 C C A G C T G C A C A C C A C T T C C G G A G G T G A G A A G G C C A C T G G C C T G A A G C C T G T T G T C A T C C C  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
 G G T C G A C G T G T G G T G A A G G C C T C A C T C T C G G G T G A C C G G A C T T C G G A C A A C A G T A G G G  
 A G G A G G C T C T T G G C C C T G C C A G C C T T C C T A T C C T G C C T G C A C T C C C A G T C T C C T C C A  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 T C C T C C G A G A A C C G G A C G G T C G G G A A G G G A T A G G A C G G A C G T G A G A G G T C A G A G G G A G G T  
 G C C T C C T C T C C C T C T G G A T G T G A G A G A A G G G A A G G G T G A A C C A A G G G T C C T A T G A C T  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
 C G G A G G A G A G G G A G A C C T A C A C T C T C T C C T C T T C C A C T T G G T T C T T C C A G G G A T A C T G A  
 T C A G C C C A T T C A G C T T T G T T T C T G G C T G C C C T A T A C T C C T C C A A A G G C C G T G C C T T G  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
 A G T C G G G T A A A G T C G A A A C A P A A A G A C C G A C G G G A T A T G A G G A G G T T C C G G A C G G G A A C  
 G T T C T A G G G C T A G T C C C A G C A G T G A G A A A A A G A A A A A A T A G C T G A T C A G A G C T G G A A G A C  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
 C A A G A T C C C G A T C A G G G T C G T C A T C T T T C T T T T A T C G A C T A G T C T C G A C C T T C T G  
 A A G G G A G G G G A A G A A G G C T G G G T G T C T C C C C T G T T T T C T G G T T A T T A A G C A G G G C T T G  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 T T C C C T C C C C T T C T T C C G A C C C A C A G A G A G G G A C A P A A A A G C C C A T T A T T C G T C C C G A A C

Figur 1-1

2 / 10

1861 CTCTCCCTCCTTCTCCGACATCTAGCATGAGCCAAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG 1920  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAGAGGGAGGAAGAAGGGGTGTAGGATCCTACTCGGTTACTAAGGAAATCCCCGAGACTCC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
1921 AAGGCAACACAATGGTACCCAAAGAACTGNTACGTCAGCCAGCAGGAGCTGAAGCCATTTC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
1981 CCTTTGGTGTCCGCATTGACTA2GTGCTTTACAGGTCAAGGCTCCTCCCTTCAGCATGCT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GGAAACCACAGGCGTAAGTGAAGAAATGTTCCAGTCAGGAGGGAAAGTTGTACGA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2041 TTCATATGCTGTCTCTTGTCTACTAACCTCTTAGATCCTTTGCTCAGNTAGTCTAG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
AAGTATAACGACACAGAGACAGACATGATTGGACACATCTAGGAACGAGTCNATCAGATC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2101 TCTTGGACCACTGATGGTGCAGAAGTGGGTTAAGCCGGGAGGTGGTTCTCTGGAAAGAGGC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
AGAACCTGGTCACTACCCACCTTCCAGCCATGGACCTGGACCAAGAGACCCCTTCTCCG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2161 CCTCATATATAAGCTTCTTNTGGCGCTTACTTTCTTACAGCAGCTTCTGGGTTTACAT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAGTATATATTGGAGAGAAGAAGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGACCCAAAATGTA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2221 CTCCTGTAGAGTTTGAAAGACACTAACAGACAGCTTACAGGGCACCCCCCTCTC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAGGACATTCTCAAAACTTGGTGTGTCTGAGACTGGGANTGTCCCCGTGGGGGAGAG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2281 TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTGTAGGCACAGCCCCCCACAGCAGAAC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
AACTAGTACTTCGGGACTACCGATGAGACAAACACTCCGTGTCGGGGGTGTCGTCTGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2341 CCAGCTCTACCCACGGTGAGTCACCCCCCAACCTTCCCTGGCCCTTGCCCCGCTTGAAGC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GGTCGAGATGGGTGCCACTCAGTGGGGTGGGAAGGAACCGGGAACGGGGCGAACCTCG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2401 AGCCCTTCCACTCTGACTCTCTCCCTGCCCCACTCCCCCTGCTCTGTTTAGGACCAGCAG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TCGGGAAGGTGAGAACTGAGAGAGGACGGCGTACGGGACGAGACAAACATCCTGGTCGT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2461 AGAGGTGCCGTTGATGTGTGCTAAAGGAGGCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGATGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2521 TCTCCAGCGGCCACTACACACACAGATTCCCTCCGGACCTCCCTCGACCCAGACCGTAC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCTGGGCTGCTTCTCC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GAGTCGAGCGACCACCGCGTGGAAAGCGATCGATACACTAACCGGACCCGACGAAGAGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2581 TGGCACTGCTGTGTCTGGCGCTGGAGGGAGGGGCCGGGAAGCTGCCATACTGCTCT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ACCGTGACGACACACAGGACCGCCGACCTCTCCCGGCCCTTCGACGGTATGACGAGA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2641 GGACCCCCAGTGTAGGGCTGGTGCTGGCAGGTGCAATTCTACCTCTTCCACGTACAGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CCTGGGGGTACATCCCGACCGACACCCGTCAAGTAAAGATGGAGAAGGTGCATGTCC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2701 AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCCAGGCTGAGCTCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TCCAGTTACCGAATATATCCCGGTCGGGACTCGAGGCTGATCACCGATCCCTCCCGTCC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
2761 AGGCCAGGATCTGGGCCAGGGCTCAGCCAGGCCACTCTGGGGCAGCAGGAGGGGG  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TCGGGCTCTAGACCCGGGTCTCGGASTCGAGGCTGATCACCGATCCCTCCCGTCC  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

3 / 12

2821 -----+-----+--- 2852  
TGTCTTGATTTCTTGTТАTTCGAACCGGGTT

Figur 1-3

卷之三

## Mouse Neutral Sphingomyelinase (nSMase) gene sequence

Figure 2-1

5 / 12

cccaggcggtgggCTGCAGCCTCGGAGCCACCTTCAGTCCCCTCTCGCACATGCCTAGGA  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
 gggtcgcacccGACGTGGAGGCCCGGTGAAAGGTCAAGGGAGAGCGTGTACGGATCCT  
  
 AGGAAGCAGGTCTTCTTCAGCCGAGCTAGACCCCTGTCCCTCCGAACCACCAAAGTCCAC  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
 TCCTCGTCCAGAAGAAGTCGGCTCGATCTGGGACAGGAAGGCTTGGTTCAAGGTG  
  
 ATCGCCTAAAGACCAGAGCTTGGGTGGTGAGCAATCACCAAAGTCCCTATCATCCAA  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
 TAGCGGATTCTGGTCTCGAACCCACCAACGTCGTAGTGGTTCAAGGATAGTAGGTT  
  
 GCTGAGGTGATGACAGCAGTAATCGTCCAAACCTGGCCCATGTCTTCCTTTAAATGA  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
 CGACTCCACTACTGTCGTCAATTAGCAGGGTTGGACCGGGTACAGAAAGGAAJATTTACT  
  
 TTTACTTTATTTATGTACATTGGTGTGCTGTATGTATGTCTGTGAAGGTGC  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
 AAATGAAAATAAAATACATGTAACCACAAAACGGACATACATACAGACACACTTCCACG  
  
 CAGATTCTCTGGAACGGAGTTACAGACAGTTGTAAGCTGTATGTGCTTGCTGGAAATT  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
 GTCTAAGAGACCTTGACCTCAATGTCTGTCAACATTGACAGTACACGAACGACCTTAA  
  
 GAACTGCTGACCCATCTCTGCCCCCTGCGTCTCCACCCCTTTAGGGACATCCCC  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
 CTTGACGACTGGTAGAGAAGACGGGGACGCAGGAGGTGGGAAAATCCCTGTAGGGGA  
  
 ACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTGGAGACTTTCTGAACTTGGAAA  
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
 TGGACTCGTTGTATCCCGCTGGCGTACTTCGCAACCCCTGTAAAGACTTGAACCTT  
  
**E II**  
 ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGAGGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG  
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
 TGAAACTAGACCGAGAGGACCTCCACTCCAACATCCCGTCGATCCAACCTCCTCCC  
  
 CAGCAGGCGGCAGGCGGGCAGGAAAACCTGTTCTGTCTGGATGAAATCCAAGCAA  
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
 GTCGTCCGCCGTCCCGCCCGTCTTTGAACAAGACAGAACCCCTACTTGGTTCGTT  
  
 GTATCCTCACCTTCTCCAGGTGTTGGAGTGAGCAGGACTCCCAGTACCTAAGGCAA  
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
 CATAGGAGTGGAAAGAAGGAGGTCCACACCTCACTCGTCTGAAGGGCATGGATTCCGTT  
  
**E III**  
 AGGCTATCGTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTTCTC  
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
 TCCGATAGCGAGTGGATAGGTCTACGTGTGATGAAGTCTTCACTTTCGACACAAGAG  
  
 AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCCAAACATTCTGCTTGACCCCTCGATCTTCTCC  
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
 TCGGACAAGAGTCTGCTCCCTCGAGAGGTTGTAAGAACGAAACGTGGAGCTAGAAGAAGG  
  
 TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTACCCCTCATTTGCAAGGGCTGCTGTCTTAGGCTT  
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
 AGACCCACACTCTCTCGTCCGGCAGTGGAGTAGAACGTTCCCGACGACAGAACCGAA  
  
 TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT  
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
 ACAAGACCCCAACTAGAAATCGTCATCTCGACCCCTCTGGCGCCTCCCTCGACCGA

卷之二

GGGTACTCCCCCTCTGCTTCTGTTATTAAACCAAGAGTTGGTTTCAGCGGGATGAT 1841  
 CCCATGAGGGGAGGAACGAGAAGACCAATAATTGTTCTCAACCXAAAGTCGCCCTACTA  
**E IV**  
 AGGCAGTGCCCTCTGTGTCTCCAAACACCCAACTCAGGAATCTTCAGCATGTCTA 1801  
 TCCGTCAACGGAGACACACAAGAGGTTGTGGGTTAGGTCTTTAGAAGGTGTAAGAT 1860  
 CAGTCTAAATGGTTACCCCTACATGGTAAGGATCTTCCCTATCCTTGCTAACACAGAC 1861  
 GTCAGACTTACCAATGGGATGTACCATTCCTAGAGAAGGCAAGAACATTGTGTCG 1920  
 TGGACCGAGCCTCCTGGGGCTTCCAGGAGGGTGTCAAGTACCCCTGAGTTTTGTCTTC 1921  
 ACCTGCCTCGGAAGGACCCCCGAACCCCTCCTCCCACAGTCATGGCACTCAGAACAGAAG 1980  
 TCTTCCTGCAGTCCATCATGGAGACTCGTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGCTGCTGGTG 1981  
 AGAACCGCACGTCAAGGTAGTACCTCTGACCAAGACACCCCCCTCAGACACCCCCAGCAC 2040  
**E V**  
 CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGTCAATGCCCTACGTACTCATGTGAGTGGGCTAGCCAG 2041  
 GAGGCACATTCAACCTGACCAAGAGTTACGGATGCACTGAGTACACTCACCCCGATCGGT 2100  
 GCTTAGCCAGTGGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT 2101  
 CGAATCCGTACCCAGTTCTGCGGGTTACGATACCACCTCTCTGCGGTATCAATCA 2160  
 TCTGCTCCCTGGGGATAAGGCATGGATCAGAAGCTAGCATTGGCAAGGTTCACCCATT 2161  
 AGACGACGGACCCCTATTCCGTACCCCTAGTCTCGATCGTAACCGTTCCAAGTGGTAA 2220  
 CCCTGTCAACACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTCAAGACAGCCTCTCTTG 2221  
 GGGACAGTGTGAGACGGTACACTGTCTACTGTTGAACAAAGTCTGTGCGGAAGAGAAACT 2280  
 TTTCACCTATTCCACTTTAGCTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTG 2281  
 AAAGTGGATAAGGTGAAATCGATGTACGACTCATGTCGGCTGTTCTGTAGATGAAAC 2340  
**E VI**  
 CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGAACTGGCCAGTTCATCCAGTGTGAGCCTGGGCT 2341  
 GTGTGGCACACCGGGTTCGAACCCCTTGACCGGGTCAAGTAGGTACACACTCGGACCCGA 2400  
 TGATGGGGCTGTGGGTGGGGACGGGGTTGAGGGATGNGNAANTTATCCTTGAAAGAGGG 2401  
 ACTACCCCCGACACCCCAACCCCTGCCCTACNCNTTAAATAGGAACCTCTCCC 2460  
 CACATAATAAGGGAAAGAATTTCCTCTTGCCTCTTCCAGCCACACATCCA 2461  
 GTGTATTATTCCCTTCTTAAAGGAGGAACGGCGAGAAGGGGGTTGAGTCGGTGTAGGT 2520  
**E VII**  
 AGAATGCAGATGTGGTTCTATTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAGACCTGGGCT 2521  
 TCTTACGTCTACACCAAGATAACACACCTCTGAGTTACGTCGGGTTCTGGACCCGA 2580

Figur 2-3

7 / 12

Figur 2-4

6 / 12

9 / 12

TCCCTTGGGNCCNAANCCNTGGCCGGNCTTGGCTTTCCCCCTTCCAAGNATTTC  
4261 -----+-----+-----+-----+-----+ 4320  
AGGGAACCCCNNGNTTNGGNACCGGCCNGAACCGAAAAGGGGGAAAGGGTTCNTAAAG

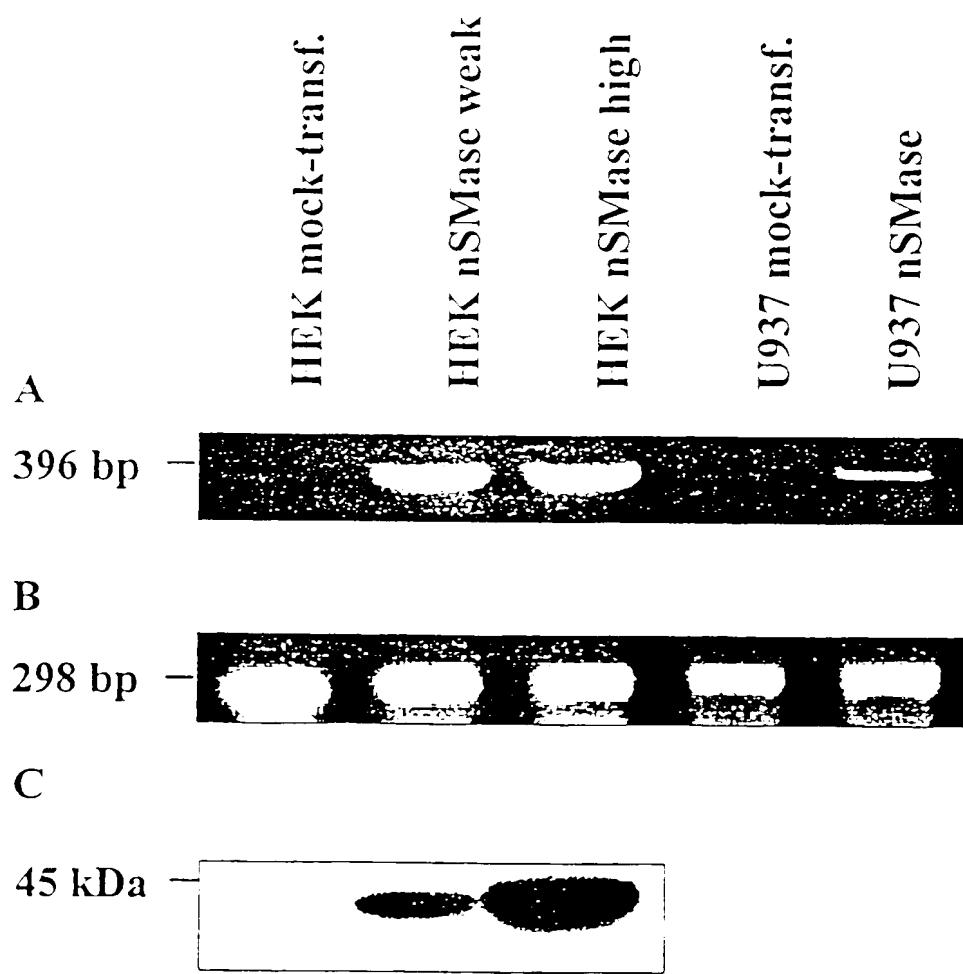
AAANNTTCCCTNGGAAANCCCTTGNTTGGNAAACCNAATNANGAACCANGCCAANNNT  
4321 -----+-----+-----+-----+-----+ 4380  
TTTNAAGGGANCCTTNNGGGAACNAACCNTTGGNTTANTNCTGGTNCGGTTNNNA

TGCCAANAAACCNTTGGCAAAGGGGNAAATTCAACAANGGGNAATTGGGGAAACCC  
4381 -----+-----+-----+-----+-----+ 4440  
ACGTTNTTGGNAAACCGTTCCCCNTTAAGTNGTNCcccNTAACCCCTTGGG

NTGGGTTTNCCTAAGGGCCCNAANANT  
4441 -----+-----+-----+ 4468  
NACCCAAANGGGTTCCCGGGNTNTNA

Figur 2-6

10 / 12



Figur 3

## mnSMase "konventional" Knock Out

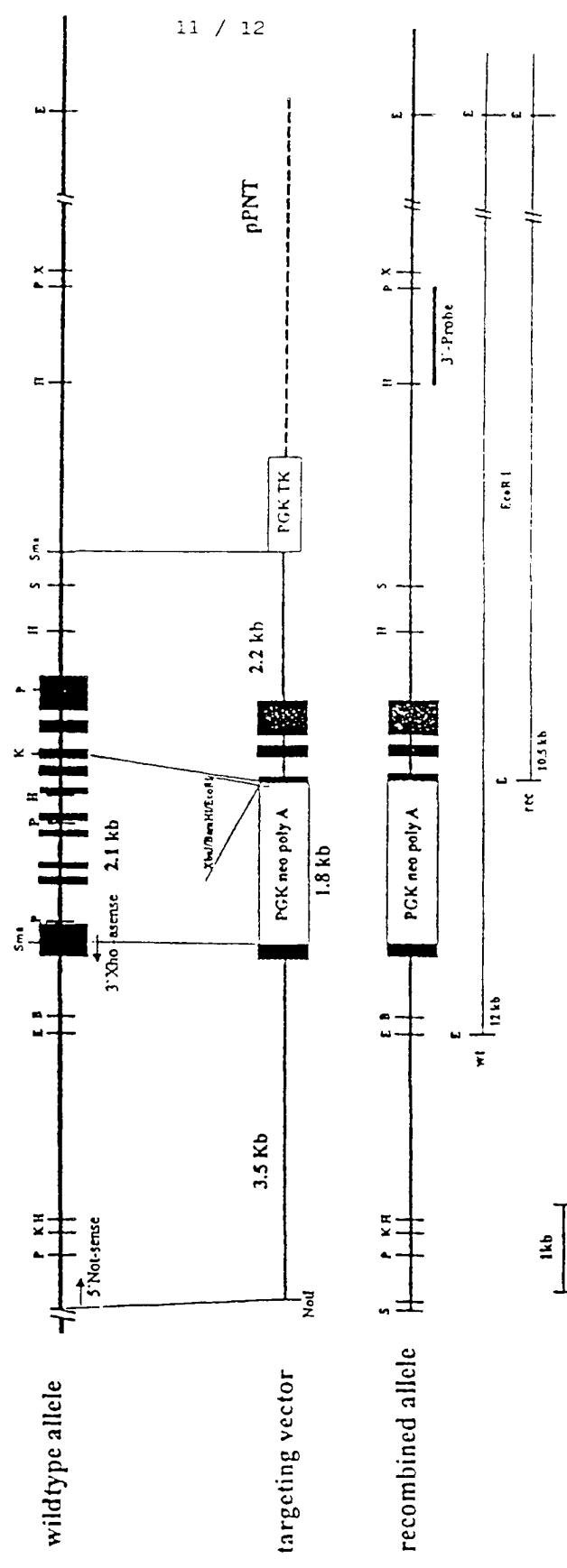
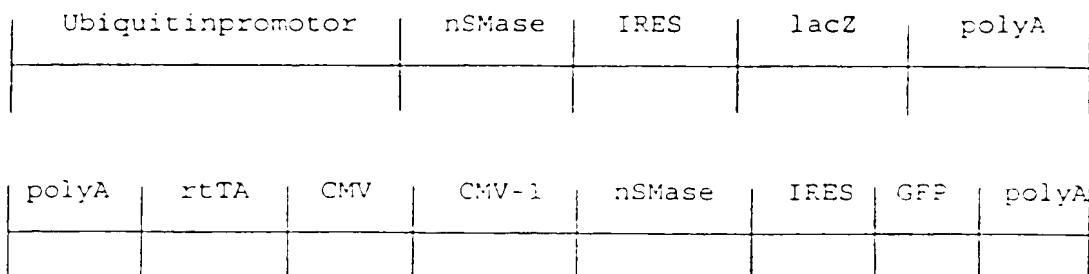


Figure 4

12 / 12

## Konstrukte zur Generierung transgener Mausmutanten



Ubiquitinpromotor: Regulationssequenz des Ubiquitin-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

nSMase: neutrale Sphingomyelinase

lacZ: lacZ, Gen kodiert für die  $\beta$ -Galaktosidase

polyA: Erkennungssignal für die Termination der Transkription und Polyadenylierung

CMV: Cytomegalovirus-Promotor des Cytomegalovirus-Gens, das eine ubiquitäre Transkription steuert.

rtTA: reverser Transaktivator, bindet an den Minimalpromotor und steuert dadurch die Transkription. Die Bindungseigenschaften des Transaktivators werden durch Tetrazyklin beeinflußt. Zugabe von Tetrazyklin läßt den Transaktivator an den Minimalpromotor binden und startet die Transkription, Wegnahme von Tetrazyklin verhindert die Bindung des Transaktivators an den Minimalpromotor und verhindert die Transkription.

CMV-1: Minimalpromotor, Bindung des Transaktivators startet die Transkription.

IRES: internal ribosomal entry sequence, virales Initiationssignal für die Translation.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Memorec Stoffel GmbH
- (B) STRASSE: Stoeckheimer Weg 1
- (C) ORT: Koeln
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 50829

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neutrale Sphingomyelinase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 423 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Ile Phe Asn Leu Asn Cys  
1 5 10 15

Trp Gly Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Arg Arg  
20 25 30

Leu Gly Asp Phe Leu Asn Gln Glu Ser Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu  
35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Lys Leu Ser  
50 55 60

Pro Thr Tyr Pro Ala Ala His His Phe Arg Ser Gly Ile Ile Gly Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Leu Thr Gln His  
85 90 95

Ile Tyr Thr Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Ile His His Gly Asp Trp  
100 105 110

Phe Ser Gly Lys Ala Val Gly Leu Leu Val Leu His Leu Ser Gly Met  
115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Asn Arg Gln  
130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Leu Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala  
145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Lys Ala Asp Val Val Leu Leu Cys  
165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Glu Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys  
180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Tyr Leu Glu Thr Arg Asp Phe Lys  
195 200 205

Gly Ser Glu Glu Gly Asn Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser  
210 215 220

Gln Gln Glu Leu Lys Pro Phe Pro Phe Gly Val Arg Ile Asp Tyr Val  
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Gly Phe Tyr Ile Ser Cys Lys Ser Phe Glu  
245 250 255

Thr Thr Thr Gly Phe Asp Pro His Ser Gly Thr Pro Leu Ser Asp His  
260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Phe Val Arg His Ser Pro Pro Gln Gln  
275 280 285

Asn Pro Ser Ser Thr His Gly Pro Ala Glu Arg Ser Pro Leu Met Cys  
290 295 300

Val Leu Lys Glu Ala Trp Thr Glu Leu Gly Leu Gly Met Ala Gln Ala  
 305 310 315 320  
  
 Arg Trp Trp Ala Thr Phe Ala Ser Tyr Val Ile Gly Leu Gly Leu Leu  
 325 330 335  
  
 Leu Leu Ala Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Gly Gly Ala Gly Glu  
 340 345 350  
  
 Ala Ala Ile Leu Leu Trp Thr Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Trp Ala  
 355 360 365  
  
 Gly Ala Phe Tyr Leu Phe His Val Gln Glu Val Asn Gly Leu Tyr Arg  
 370 375 380  
  
 Ala Gln Ala Glu Leu Gln His Val Leu Gly Arg Ala Arg Glu Ala Gln  
 385 390 395 400  
  
 Asp Leu Gly Pro Glu Pro Gln Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gln Gln Glu  
 405 410 415  
  
 Gly Asp Arg Thr Lys Glu Gln  
 420

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 419 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Leu Asn Phe Ser Leu Arg Leu Arg Val Phe Asn Leu Asn Cys  
 1 5 10 15

Trp Asp Ile Pro Tyr Leu Ser Lys His Arg Ala Asp Arg Met Lys Arg  
 20 25 30

Leu Gly Asp Phe Leu Asn Leu Glu Asn Phe Asp Leu Ala Leu Leu Glu  
 35 40 45

Glu Val Trp Ser Glu Gln Asp Phe Gln Tyr Leu Arg Gln Arg Leu Ser  
50 55 60

Leu Thr Tyr Pro Asp Ala His Tyr Phe Arg Ser Gly Met Ile Gly Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Cys Val Phe Ser Lys His Pro Ile Gln Glu Ile Phe Gln His  
85 90 95

Val Tyr Ser Leu Asn Gly Tyr Pro Tyr Met Phe His His Gly Asp Trp  
100 105 110

Phe Cys Gly Lys Ser Val Gly Leu Leu Val Leu Arg Leu Ser Gly Leu  
115 120 125

Val Leu Asn Ala Tyr Val Thr His Leu His Ala Glu Tyr Ser Arg Gln  
130 135 140

Lys Asp Ile Tyr Phe Ala His Arg Val Ala Gln Ala Trp Glu Leu Ala  
145 150 155 160

Gln Phe Ile His His Thr Ser Lys Asn Ala Asp Val Val Leu Leu Cys  
165 170 175

Gly Asp Leu Asn Met His Pro Lys Asp Leu Gly Cys Cys Leu Leu Lys  
180 185 190

Glu Trp Thr Gly Leu His Asp Ala Phe Val Glu Thr Glu Asp Phe Lys  
195 200 205

Gly Ser Asp Asp Gly Cys Thr Met Val Pro Lys Asn Cys Tyr Val Ser  
210 215 220

Gln Gln Asp Leu Gly Pro Phe Pro Ser Gly Ile Arg Ile Asp Tyr Val  
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ala Val Ser Glu Phe His Val Cys Cys Glu Thr Leu Lys  
245 250 255

Thr Thr Thr Gly Cys Asp Pro His Ser Asp Lys Pro Phe Ser Asp His  
260 265 270

Glu Ala Leu Met Ala Thr Leu Tyr Val Lys His Ser Pro Pro Gln Glu  
275 280 285

Asp Pro Cys Thr Ala Cys Gly Pro Leu Glu Arg Ser Asp Leu Ile Ser		
290	295	300
Val Leu Arg Glu Ala Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gly Ile Ala Lys Ala		
305	310	315
Arg Trp Trp Ala Ala Phe Ser Gly Tyr Val Ile Val Trp Gly Leu Ser		
325	330	335
Leu Leu Val Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Gly Glu Glu Ala Arg Glu		
340	345	350
Val Ala Ile Ile Leu Cys Ile Pro Ser Val Gly Leu Val Leu Val Ala		
355	360	365
Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Lys Gln Glu Ala Lys Gly Leu Cys Arg		
370	375	380
Ala Gln Ala Glu Met Leu His Val Leu Thr Arg Glu Thr Glu Thr Gln		
385	390	395
Asp Arg Gly Ser Glu Pro His Leu Ala Tyr Cys Leu Gln Gln Glu Gly		
405	410	415
Asp Arg Ala		

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1662 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GC GGCC CGCGA CCGCCGGGGA CGAGCTTGGGA GGAAAAGGAA CCGGGAGCCG CCCACCCGGG	60
GGCGCTCTCC GGACCCCCAG GGTCTAGCG CGCGGCCCTT ACCGAGCCTG GGCGCCCGGA	120
TTTCGGSAGC GGATCGCCTT TCCGGGTTGG CGGCCCGCCT GATTGGGAAC AGCCGGCCGG	180

TTGCCGGGGG AACGCCGGAG TCGGGCCCGA CCTGAGCCAC GCGGGCTTGG TGCCCCACCTG	240
TGCAGCGCCGC CTGCGAAGAA GGAACGGTCT AGGGAGAAGG CGCCGCCGGC CGCCCCCGTC	300
CCCACCGCGGG CCGTCGCTGG AGAGTTCGAG CCGCCTAGCG CCCCTGGAGC TCCCCAACCA	360
TGAAGCTCAA CTTCTCCCTG CGACTGCCGA TCTTCAACCT CAACTGCTGG GGCAATTCCGT	420
ACTTGAGCAA GCACCGGGCC GACCGCATGA GGCGCCTGGG AGACTTTCTG AACCAGGAGA	480
GCTTCGACCT GGCTTGCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG TACCTGAGAC	540
AGAACGCTGTC ACCTACCTAC CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGCGGAATC ATTGGCAGTG	600
GCCTCTGTGT CTTCTCCAAA CATCGAATCC AGGAGCTTAC CCAGCACATC TACACTCTCA	660
ATGGCTACCC CTACATGATC CATCATGGTG ACTGGTTCAAG TGGGAAGGCT GTGGGGCTGC	720
TGGTGCTCCA TCTAAAGTGGC ATGGTGCTCA ACGCCTATGT GACCCATCTC CATGCCGAAT	780
ACAATCGACA GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTGGC CCAAGCTTGG GAATTGGCCC	840
AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAAGGCAG ACGTGGTTCT GTTGTGTGGA GACCTCAACA	900
TGCACCCAGA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAGGAGTG GACAGGGCTT CATGATGCCT	960
ATCTTGAAAC TCGGGACTTC AAGGGCTCTG AGGAAGGCAA CACAATGGTA CCCAAGAACT	1020
GCTACGTCAG CCAGCAGGAG CTGAAGCCAT TTCCCTTGG TGTCCGCATT GACTACGTGC	1080
TTTACAAGGC AGTTTCTGGG TTTTACATCT CCTGTAAGAG TTTTGAAACC ACTACAGGCT	1140
TTGACCCCTCA CAGTGGCACC CCCCTCTCTG ATCATGAAGC CCTGATGGCT ACTCTGTTG	1200
TGAGGCACAG CCCCCCACAG CAGAACCCCA GCTCTACCCA CGGACCAGCA GAGAGGTCGC	1260
CGTTGATGTG TGTGCTAAAG GAGGCCTGGA CGGAGCTGGG TCTGGGCATG GCTCAGGCTC	1320
GCTGGTGGGC CACCTTCGCT AGCTATGTGA TTGGCCTGGG GCTGCTTCTC CTGGCACTGC	1380
TGTGTGTCCT GGCGGCTGGA GGAGGGCCG GGGAAAGCTGC CATACTGCTC TGGACCCCCA	1440
GTGTAGGGCT GGTGCTGTGG GCAGGGCAT TCTACCTTT CCACGTACAG GASGTCAATG	1500

GCTTATATAG GGCCCAGGCT GAGCTCCAGC ATGTGCTAGG AAGGGCAAGG GAGGCCAGG	1560
ATCTGGGCC AGAGCCTCAG CCAGCCCTAC TCCTGGGCA GCAGGAGGGG GACAGAACTA	1620
AAGAACATA AAGCTTGGCC CTTTAAAAAA ·AAAAAAAAAA AA	1662

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1627 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGCTGGTGG AAGCCGAGCC GGGAAACAAGG GAGGAACCTG TAGGCCGCGG TGCGAGAAC	60
CACCGAAGAC CTAAGAATCT GGAACAGTCC ACCCGAGATT CCTTCCAGGA CTGCCGGCGG	120
CTCGCGCACC AGCCCCGGAT TTGCAGCCGA CCTTCTTCG GGGTGGAAAGG ACGGCCTTG	180
TCCCAGTAAC GCAGGAGTCG CCCCCCACCC CCAACCAGCT CGCGTTCTG GGTCGGGGCA	240
GCGCAGGACA GGGCAATAAG CCTGTGCGCG CAATCCGCCT CGCCGCCCTT GCTCCGAAGC	300
ACTCCAGCCA TGAAGCTCAA CTTTCTCTA CGGCTGAGAG TTTCAATCT CAACTGCTGG	360
GACATCCCC ACCTGAGCAA ACATAGGGCG GACCGCATGA AGCGCTTGGG AGACTTCTG	420
AACTTGGAAA ACTTGATCT GGCTCTCCTG GAGGAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG	480
TACCTAAGGC AAAGGCTATC GCTCACCTAT CCAGATGCAC ACTACTCAG AAGCGGGATG	540
ATAGGCAGTG GCCTCTGTGT GTTCTCCAAA CACCAATCC AGGAAATCTT CCAGCATGTC	600
TACAGTCTGA ATGGTTACCC CTACATGTTC CATCATGGAG ACTGGTTCTG TGGGAAGTCT	660
GTGGGGCTGC TGGTGCTCCG TCTAAGTGGA CTGGTGCTCA ATGCCTACGT GACTCATCTA	720
CATGCTGAGT ACAGCCGACA GAAGGACATC TACTTGAC ACCGTGTGGC CCAAGCTTGG	780

GAACTGGCCC AGTTCATCCA CCACACATCC AAGAATGCAG ATGTGGTTCT ATTGTGTGGA	840
GACCTCAATA TGCACCCCAA AGACCTGGGC TGCTGCCTGC TGAAAGAGTG GACAGGGCTC	900
CATGATGCTT TCGTTGAGAC TGAGGACTTT AAGGGCTCTG ATGATGGCTG TACCATGGTA	960
CCCAAGAACT GCTACGTCAG CCAGCAGGAC CTGGGACCGT TTCCGTCTGG TATCCGGATT	1020
GATTACGTGC TTTACAAGGC AGTCTCTGAG TTCCACGTCT GCTGTGAGAC TCTGAAAACC	1080
AATACAGGCT GTGACCCCTCA CAGTGACAAG CCCTTCTCTG ATCACGAGGC CCTCATGGCT	1140
ACTTTGTATG TGAAGCACAG CCCCCCTCAG GAAGACCCCT GTACTGCCTG TGGCCCACTG	1200
CAAAGGTCCG ATTTGATCAG CGTGCTAAGG GAGGCCAGGA CAGAGCTGGG GCTAGGCATA	1260
GCTAAAGCTC GCTGGTGGGC TGCATTCTCT GGCTATGTGA TCGTTGGGG GCTGTCCCTT	1320
CTGGTGTGTC TGTGTGTCCT GGCTGCAGGA GAAGAGGCCA GGGAAAGTGGC CATCATCCTC	1380
TGCATACCCA GTGTGGGTCT GGTGCTGGTA GCAGGTGCAG TCTACCTCTT CCACAAGCAG	1440
GAGGCCAAGG GCTTATGTCG GGCCCAGGCT GAGATGCTGC ACGTTCTGAC AAGGGAAACG	1500
GAGACCCAGG ACCGAGGCTC AGAGCCTCAC CTAGCCTACT GCTTGCAGCA GGAGGGGGAC	1560
AGAGCTTAAG AGCTTAACAA TAAAACTTGC TTGACACACA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1620
AAAAAAA	1627

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4464 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACTCGATCC CGCGAACGC TCGCTCGCGC TCCGAGTCTC TTCCAGGTCTG CCCTTCCTTG	60
---	----

CGACCAGCAT TTGTTCTCTA TGCCCCATC CAGCCCTAGG ACAGAACGTG GACCCCCGCC	120
CGCCAGCGCA GGCGACACCG CGGCAGGGGG CTGAGGTGCG CACGGCGTCT GGGCGAGGG	180
GTTACCTCAG CGATGGTCCT TGACACCTGA AAGCTGGAGC TTTGAAGAG CCCCACCACC	240
TTCAGCTTCA GGGGCGGCTC GGGCGGCAAC CGCACGTGAC ATGCTGGGG CTTCGACTTG	300
GGCCGGCACG GCTGCTGGGT GGCCATGGCA GGGACAGCAG AGAGCCCGGA ACACAAATAG	360
TGCGAGTCGC CAGGGCAACC CGGTGGCTCC TCCCCGAACG CCCGCAAGGG GCGGGACCTG	420
AGTGAGTTCG TGGGCGGGGC CTCGCATCAA CTTCAAGCCT GTTGCTGGTG GAAGCCGAGC	480
CGGGAACAAG GGAGGAACCT GTAGGCCGCG GTGCGGATAA CCCACCGAAG GACCTAAGAA	540
TCTGGAACAG TCCACCCGAG ATTCCCTCCA GGACTGCCGG CGGACTCTCG CATTCAAGCCC	600
GGGATTGCA GCCGACCTTC TTTCCGGGTG GAATGACGGC CTTTGTCCCA GTAACGCAGG	660
AGTAGCCCCC CACCCCCAAC CAGCTCGCGT TCCTGGGTG GGGCAGCGCA GGATAGGGCA	720
ATAAGCCTGT GCGCGCAATC CGCCTCGCCG CCCTGCTCC GAAGCACTCC AGCCATGAAG	780
CTCAACTTTT CTCTACGGCT GAGAGTTTC AATCTCAACT GCTGGTAAGT AAGTGCTCCC	840
AGGC GTGGGC TGCAGCCTCG GAGCCACCTT CCAGTCCCCT CTCGCACATG CCTAGGAAGG	900
AAGCAGGTCT TCTTCAGCCG AGCTAGACCC TGTCTTCCC GAACCACCAA AGTCCACATC	960
GCCTAAAGAC CAGAGCTTGG GTGGTTGCAG CAATCACCAA AGTCCCTATC ATCCAAAGCT	1020
GAGGTGATGA CAGCAGTAAT CGTCCAAAC CTGGCCCATG TCTTCCTTT TAAATGATTT	1080
ACTTTTATTT TATGTACATT TGGTGTGGT CCTGTATGTA TGTCTGTGTG AAGGTGCCAG	1140
ATTCTCTGGA ACTGGAGTTA CAGACAGTTG TAAGCTGTCA TGTGCTTGCT GGAAATTGAA	1200
CTGCTGACCC ATCTCTTCTG CCCCCCTCGCGT CCTCCACCCC TTTTAGGGAC ATCCCCTACC	1260
TGAGCAAACA TAGGGCGGAC CGCATGAAGC GCTTGGGAGA CTTTCTGAAC TTGGAAAAC	1320
TTGATCTGGC TCTCCTGGAG GAGGTGAGGT TGTAGGGCAG GCTAGGTTGG AGGAGGGCAG	1380

CAGGGCGGCAG	GCGGGCGGCAG	GAAAACTTGT	TCTGTCTTGG	GATGAAATCC	CAAGCAAGTA	1440
TCCTCACCTT	CTTCCTCCAG	GTGTGGAGTG	AGCAGGACTT	CCAGTACCTA	AGGCAAAGGC	1500
TATCGCTCAC	CTATCCAGAT	GCACACTACT	TCAGAAGGTG	AAAAGCCTGT	GTTCTCAGCC	1560
TGTTCTCAGA	CGAGGAAGCT	CTCCAACATT	CTTGTCTGCA	CCCTCGATCT	TCTTCTCTG	1620
GGTGTGAGAA	GAGCAGGCCG	TCACCCCTCAT	CTTGCAGGG	CTGCTGTCTT	AGGCTTTGTT	1680
CTGGGGTTGA	TCTTAGCAGT	AGAGCTGGGA	GACCGCGGAG	GGGAAGAGGG	CTGGCTGGGT	1740
ACTCCCCCTCC	TTGCTCTTCT	GGTTATTAAG	CAAGAGTTGG	TTTCAGCGG	GATGATAGGC	1800
AGTGGCCTCT	GTGTGTTCTC	AAAACACCCA	ATCCAGGAAA	TCTTCCAGCA	TGTCTACAGT	1860
CTGAATGGTT	ACCCCTACAT	GGTAAGGATC	TCTTCCCTAT	CCTTGCTAAC	ACAGACTGGA	1920
CGCAGCCTTC	CTGGGGCCTT	GGCAGGAGGG	TGTCAGTACC	CTGAGTTTTT	GTCTTCTCTT	1980
GCCTGCAGTT	CCATCATGGA	GAUTGGTTCT	GTGGGAAGTC	TGTGGGGCTG	CTGGTGCTCC	2040
GTCTAAGTGG	ACTGGTGCTC	AATGCCTACG	TGACTCATGT	GAGTGGGGCT	AGCCAGGCTT	2100
AGGCAGTGGG	TCAAGCAGCC	CAATGCTATG	GTGGAGAAGA	GACGCCACTA	GTTAGTTCTG	2160
CTGCCTGGGG	ATAAGGCATG	GGATCAGAAG	CTAGCATTGG	GCAAGGTTCA	CCCATTCCCT	2220
GTCACACTCT	GCCATGTGAC	AGATGACAAG	CTTGATTCA	ACAGCCTTCT	CTTGATTTC	2280
ACCTATTCCA	CTTTAGCTAC	ATGCTGAGTA	CAGCCGACAG	AAGGACATCT	ACTTTGCACA	2340
CCGTGTGGCC	CAAGCTTGGG	AACTGGCCCA	GTTCATCCAG	TGTGTGAGCC	TGGGCTTGAT	2400
GGGGGCTGTG	GGGTGGGGAC	GGGGTTGAGG	GATGNGNAAN	TTATCCTTGA	AGAGGGCACA	2460
TAATAAGGGA	AGAATTTCCT	CCTGCCGCT	CTTCCCCCAA	CTCAGCCACA	CATCCAAGAA	2520
TGCAGATGTG	GTTCTATTGT	GTGGAGACCT	CAATATGCAC	CCCAAAGACC	TGGGCTGCTG	2580
CCTGCTGAAA	GAGTGGACAG	GGCTCCATGA	TGCTTCGTT	GAGACTGAGG	ACTTTAAGGT	2640
GAGAGACTGT	TTCCCACCAA	CTCCACACTT	GTTCCAGTCT	TCTGTCTCT	TAGCATCCTA	2700

GCCACCTGTT	TCCCTAGGGC	TCTGATGATG	GCTGTACCAT	GGTACCCAAG	AACTGCTACG	2760
TCAGCCAGCA	GGACCTGGGA	CCGTTCCGT	CTGGTATCCG	GATTGATTAC	GTGCTTACA	2820
AGGTCAAGCT	CTTATTCCCG	GTGTGCCCTC	TCCAGTATCT	TCCTTCCTCT	GTCACTAGCC	2880
CACGCTTTAG	TTCAGCTACA	GTCTGGGCC	ACTGATGGCT	AAAGAATAGA	ATCCTGTCGG	2940
CTGGTTCTCT	GGGAGAATT	AAGCTTCTCC	ATGTTCTTGC	TCTTCCTAGG	CAGTCTCTGA	3000
GTTCCACGTC	TGCTGTGAGA	CTCTGAAAAC	CACTACAGGC	TGTGACCCTC	ACAGTGACAA	3060
GCCCTTCTCT	GATCACGAGG	CCCTCATGGC	TACTTTGTAT	GTGAAGCACA	GCCCCCCTCA	3120
GGAAGACCCC	TGTACTGCCT	GTGGTAAGCA	GCATTTCTT	TGCCCTCTCT	ACTTTAACGC	3180
AGCCCCGCCT	CCATCCTGAC	CCTCCCTGC	TCTACGTTCT	CTCTTTTCC	AGGCCCACTG	3240
GAAAGGTCCG	ATTTGATCAG	CGTGCTAAGG	GAGGCCAGGA	CAGAGCTGGG	GCTAGGCATA	3300
GCTAAAGCTC	GCTGGTGGGC	TGCATTCTCT	GGCTATGTGA	TCGTTGGGG	GCTGTCCCTT	3360
CTGGTGTGTC	TGTGTGTCCT	GGCTGCAGGA	GAAGAGGCCA	GGGAAGTGGC	CATCATCCTC	3420
TGCATAACCA	GTGTGGGTCT	GGTGCTGGTA	GCAGGTGCAG	TCTACCTCTT	CCACAAGCAG	3480
GAGGCCAAGG	GCTTATGTCG	GGCCCAGGCT	GAGATGCTGC	ACGTTCTGAC	AAGGGAAACG	3540
GAGACCCAGG	ACCGAGGCTC	AGAGCCTCAC	CTAGCCTACT	GCTTGCAGCA	GGAGGGGGAC	3600
AGAGCTTAAG	AGCTTAACAA	AAAAACTTGC	TTGACACACT	CTAGTGGCTC	TACCTTGTTC	3660
CTTGCAGAGG	CATGATGGGA	ACTGAAGGTC	AGTGGCCTTG	TCACTGTGTG	GCTTAGAGC	3720
GTTGGCCTCT	CACTTGCCTT	TTTGCACAC	TCCCCTCTCC	TGCCAGCACA	GAGCATAAAC	3780
CCTGTTCATG	GTCATAATCC	TTTATTGTA	AAACAACGAAG	CCTCTGACTA	AGCAGTCCAG	3840
ATGGCGGAGG	TACAGCCCTT	GTGATGGTGT	CTTGCTTACG	GGGCAGGGAG	GCAGCTAAC	3900
ATCATCTTCT	AGCCCTGGGC	TCCCATCTAT	GCAGGCATCT	CTCTGAGCCT	CCGTTCCCTCC	3960
TGGAATTGGN	TCAGAGCAAT	CCCGCTTGGT	TCACCAAACCT	CCAAACAGCT	TCCTTAAGGA	4020

CCTGGTTTCT CAAAANGGNA AGGTNCGGGC CTCCGGTCTT CAATANGTTT TCCTAAAAAG	4080
CGAAGAATGA AAANCCTAA GNNCCAACAA GGGGAACCCCT TGGNCCCAAAGGGGACCTG	4140
GGTGGTTTCC CNTTGGGCC AAANTTATCC CAAAGGGTC CAATTGAAGG GTTAACCCCC	4200
CAAAAANNAC CCNTTCCCC CGGAATTTC CAAAGGTTNC CCCCCCGGC AAAANCTCCC	4260
TTGGGGNNCC NAANSCNTGG CCCGNCTTG GCTTTCCCC CTTCCCAAG NATTCAAAN	4320
NTTCCCTNGG AAANCCCTT GNTTGGNAAA ACCNAATNAN GAACCANGCC AANINTTGCC	4380
AANAAACCN TTGGGCAAAG GGGNAAATT CANCAANGG GNAATTGGGG AAACCCNTGG	4440
GTTTNCCCAA AGGGGCCNAA NANT	4464

## (i) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2852 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ACCGCGGCCG TCGCTGGAGA GTTCGAGCCG CCTAGCGCCC CTGGAGCTCC CCAACCATGA	60
AGCCCAACTT CTCCCTGCGA CTGCGGATCT TCAACCTCAA CTGCTGGTGA GTGCGTCTGC	120
GGAGTGCAGGT CTGGGGGCCA CCTTCCGTTC GCACCCATGC AGCCTTCCTC CCCCTATCCC	180
GCCCCACGAT CTCAGGGTGT AGGGAAAACC CGAACCTCCA AAGTCCACAT CTGGCCCCAG	240
CGCCGGTGGT CCCAGCAGTC GCCTCCCTG CCCCAGCTTT CCCTTCCTTA GGGGCATTCC	300
GTACTTGAGC AAGCACCGGG CCGACCGCAT GAGGCGCCTG GGAGACTTTC TGAAACCAGGA	360
GAGCTTCGAC CTGGCTTTC TGGAGGAGGT GAGATTGTGC AGCACGGTGC GGAACCCAGG	420
CTGGGAGGAG GGACAGACCG TCCCACGTGGG GAAAGACCAA GCAGGCATCC TCACCGCTTC	480

CCTCAGGTGT GGAGTGAGCA GGACTTCCAG TACCTGAGAC AGAAGCTGTC ACCTACCTAC	540
CCAGCTGCAC ACCACTTCCG GAGGTGAGAA GCCCACTGGC CTGAAGCCTG TTGTCATCCC	600
AGGAGGCTCT TGGCCCTGCC AGCCCTTCCC TATCCTGCCT GCACTCTCCA GTCTCCTCCA	660
GCCTCCTCTC CCTCTGGATG TGAGAGAAGG AGAAGGGTGA ACCAAGAAGG TCCTATGACT	720
TCAGCCCATT TCAGCTTTGT TTTCTGGCTG CCCTATACTC CTCCAAAGGC CGTCGCCTTG	780
GTTCTAGGGC TAGTCCCAGC AGTAGAAAAA GAAAAAAAATA GCTGATCAGA GCTGGAAGAC	840
AAGGGAGGGG AAGAAGGCTG GGTGTCTCTC CCTGTTTTTC TGTTTATTAA GCAGGGCTTG	900
GCTTCAGCG GAATCATTGG CAGTGGCCTC TGTGTCTTCT CCAAACATCC AATCCAGGAG	960
CTTACCCAGC ACATCTACAC TCTCAATGGC TACCCCTACA TGGTAAGGCA GACCTTGAC	1020
CTCTTCCACC TCCCTCCCC ACCTCCAGTA ATACAAGGTA GAGGAGGCAG CCCTCTGAGA	1080
GCTGCAGGGG ATGGGCAGAA AGATGGTGGC GGTGCCCTGA GTTTCTATCT CCTCCTGCCT	1140
GCAGATCCAT CATGGTGAAT GGTCAGTGG GAAGGCTGTG GGGCTGCTGG TGCTCCATCT	1200
AAGTGGCATG GTGCTAACG CCTATGTGAC CCATGTGAGT GAAGCTGGCA GTGCCTAGGG	1260
CTGGGACATG CAGCCCAGTC CTGGGACAGA GAGATGGTAC TTCTCTAGCT CTCATACCTG	1320
GGGATGAGGT GTGGGGCAA GATTTATAA GGAAGCAATG GGCAAGGCTT ATCCATTGTA	1380
TACCAAACAC CATGCCAAGT GACAGACACA GGCTTGATTG AGACATACCC CTGGGACCCCT	1440
CAGTCTTATC TGCTGTGATC TCATCCATCT TGCTCAGCTC CATGCCAAT ACAATCGACA	1500
GAAGGACATC TACCTAGCAC ATCGTGTGGC CCAAGCTTGG GAATTGGCCC AGTTCATCCA	1560
GTGTGTGAGC CTGGGCTTGA AATGGGAAGT GGGATGGAC CCAGGGCTG AGGGTGAACA	1620
AGGCCCCAGT CATGGGAAAG AGCTGGTGAT GGAAGAACTC CCGCCTCACC AACCTGGTTC	1680
CCCCAGCCAC ACATCCAAGA AGGCAGACGT GGTTCTGTTG TGTGGAGACC TCAACATGCA	1740
CCCAGAAGAC TGGGCTGCTG CCTGCTGAAG GAGTGGACAG GGCTTCATGA TGCCTATCTT	1800

GAATCTCGGG ACTTCAGGT GAGGACTTGC CTGTTACTTC CCCACCTATA TCCCCAGCTT 1860  
CTCTCCCTCC TTCTCCCCCA CATCCTAGCA TGAGCCAATG ATTCCCTTAG GGCTCTGAGG 1920  
AAGGCAACAC AATGGTACCC AAGAACTGNT ACGTCAGCCA GCAGGAGCTG AAGCCATTTC 1980  
CCTTGGTGT CCGCATTGAC TACGTGCTTT ACAAGGTCAG GCTCCTCCCT TCAACATGCT 2040  
TTCATATGCT GTGTCTCTT GTCTACTAAC CTGTGTAGAT CCTTTGCTCA GNTAGTCTAG 2100  
TCTTGGACCA CTGATGGGTG GAAAGTGGGG TAGCCGGAG CTGGTTCTCT GGGAAAGAGGC 2160  
CCTCATATAT AAGCTTCTCT NTGGCCCTTA CTTTCCTAG GCAGTTCTG GGTTTACAT 2220  
CTCCTGTAAG AGTTTGAAA CCACIACAGG CTTTGACCCCT NACAGGGCA CCCCCCTCTC 2280  
TTGATCATGA AGCCCTGATG GCTACTCTGT TTGTGAGGCA CAGCCCCCA CAGCAGAAC 2340  
CCAGCTCTAC CCACGGTGAG TCACCCCCAC CCTTTCCCTTG GCCCTTGCCC CGCTTGAAGC 2400  
AGCCCTTCCA CTCTTGACTC TCTCCTGCC CACTGCCCTG CTCTGTTGTA GGACCAGCAG 2460  
AGAGGTCGCC GTTGATGTGT GTGCTAAAGG AGGCCTGGAC GGAGCTGGGT CTGGGCATGG 2520  
CTCAGGCTCG CTGGTGGGCC ACCTTCGCTA GCTATGTGAT TGGCCTGGGG CTGCTTCTCC 2580  
TGGCACTGCT GTGTGTCCTG GCGGCTGGAG GAGGGGCCGG GGAAGCTGCC ATACTGCTCT 2640  
GGACCCCCAG TGTAGGGCTG GTGCTGTGGG CAGGTGCATT CTACCTCTTC CACGTACAGG 2700  
AGGTCAATGG CTTATATAGG GCCCAGGCTG AGCTCCAGCA TGTGCTAGGA AGGGCAAGGG 2760  
AGGCCCAAGGA TCTGGGCCA GAGCCTCAGC CAGCCCTACT CCTGGGGCAG CAGGAGGGGG 2820  
ACAGAACTAA AGAACAAATAA AGCTTGGCCC AA 2852

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05127

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6	C12N15/55	C12N9/16	C12N5/10	C07K16/40	G01N33/50
	A61K38/43	A01K67/027			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., vol. 264, no. 21, 25 July 1989, pages 12554-12561, XP002087487 see the whole document	1-3,5-7, 9,21,24
A	---	4,8, 10-20, 22,23
P,X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2 July 1998  see abstract see figures 1,2 see claims 1-30 ---	1-3,5-7, 9,14-19, 21,24

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 December 1998

29/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte... Serial Application No.  
PCT/EP 98/05127

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation or document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, vol. 10, no. 6, 30 April 1996, page A1253 XP000644454 see abstract ---	3
A	CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., vol. 272, no. 11, 14 March 1997, XP002087488 see abstract ---	14-17
A	DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18 May 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 compare with amino acids 247-394 in sequence ID 1 ---	1-24
P, X	TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998, pages 3638-3643, XP002087489 see the whole document -----	1-11, 20-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 98/05127

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

Observation: Although the claim(s) 16 and 17 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 6 C12N15/55 A61K38/43	C12N9/16 A01K67/027	C12N5/10	C07K16/40	G01N33/50
--	---------------------------	---------------------	----------	-----------	-----------

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K A01K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
X	CHATTERJEE S. & GHOSH N.: "Neutral sphingomyelinase from human urine" J. BIOL. CHEM., Bd. 264, Nr. 21, 25. Juli 1989, Seiten 12554-12561, XP002087487 siehe das ganze Dokument	1-3, 5-7, 9.21, 24
A	---	4, 8, 10-20. 22, 23
P, X	WO 98 28445 A (CHATTERJEE SUBROTO ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 2. Juli 1998  siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen 1-2 siehe Ansprüche 1-30 ---	1-3, 5-7, 9, 14-19, 21, 24

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolliert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

11. Dezember 1998

29/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bei'r Anspruch Nr.
A	KOSTELLOW A ET AL: "REDUCTION IN EXTRACELLULAR MG2+ INDUCES SPHINGOMYELINASE, ELEVATES CERAMIDE AND RELEASES NF-KB IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS" FASEB JOURNAL, Bd. 10, Nr. 6, 30. April 1996, Seite A1253 XP000644454 siehe Zusammenfassung ---	3
A	CAI Z. ET AL.: "Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of the human breast carcinoma MCF7 cells to Tumor Necrosis Factor alpha-mediated cytotoxicity." J. BIOL. CHEM., Bd. 272, Nr. 11, 14. März 1997. XP002087488 siehe Zusammenfassung ---	14-17
A	DATABASE GENBANK Accession No. AA412649, 18. Mai 1997 HILLIER ET AL.: "H. sapiens cDNA clone IMAGE 730457 - EST." XP002087490 Vergleiche mit Aminosäuren 247-394 in Seq. ID 1 ---	1-24
P,X	TOMIUK S. ET AL.: "Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?" PRC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 95, Nr. 7, 31. März 1998, Seiten 3638-3643, XP002087489 siehe das ganze Dokument -----	1-11, 20-24

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05127

**Feld I** Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rechnerierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemaß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung:** Obwohl der(die) Anspruch(üche) 16 und 17  
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen  
Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich  
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind

**Feld II** Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle rechnerierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.  Da für alle rechnerierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

mit dem gleichen Referenzzeichen

PCT/EP 98/05127

im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9828445 A	02-07-1998	AU 5809398 A	17-07-1998

